

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 60 591.2
Anmeldetag: 23. Dezember 2002
Anmelder/Inhaber: febit AG, 68167 Mannheim/DE
Bezeichnung: Photoaktivierbare zweistufige Schutzgruppen
für die Synthese von Biopolymeren
IPC: C 07 C, C 07 B, C 07 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 15. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

Wallner

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte
European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN (bis 31.1.01)
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKÁ
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BOHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER
DIPL.-PHYS. DR.-ING. V. JORDAN
DIPL.-CHEM. DR. M. DEY
DIPL.-FORSTW. DR. J. LACHNIT

Unser Zeichen:
29562P DE/WWpu

Anmelder:
febit AG
Käfertaler Straße 190
68167 Mannheim

Photoaktivierbare zweistufige Schutzgruppen für die Synthese von
Biopolymeren

Photoaktivierbare zweistufige Schutzgruppen für die Synthese von Biopolymeren

Beschreibung

5

10

15

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biopolymeren durch schrittweisen Aufbau aus geschützten Synthesebausteinen, die zweistufige Schutzgruppen tragen. Die zweistufigen Schutzgruppen werden durch einen ersten Belichtungsschritt aktiviert und einen anschließenden chemischen Behandlungsschritt abgespalten. Es werden photoaktivierbare Komponenten verwendet, die über intramolekulare Tripletsensibilisatoren den Aktivierungsprozess erheblich beschleunigen oder/und über Fluoreszenzeigenschaften verfügen. Die zweistufigen Schutzgruppen können insbesondere im Rahmen einer Qualitätskontrolle Anwendung finden.

20

25

Die Technologie der lichtgesteuerten Synthese von Biopolymeren unter Verwendung fotolabiler Schutzgruppen eröffnet die Möglichkeit, Biochips in situ durch Synthese aus Monomer- und Oligomerbausteinen zu erzeugen. Biochips haben für die Forschung und Diagnostik ganz erheblich an Bedeutung gewonnen, da sie eine schnelle und hochparallele Bearbeitung komplexer biologischer Fragestellungen erlauben. Hierzu werden jedoch Chips von höchster Qualität benötigt, so dass ein hohes Interesse an neuen effektiveren Synthesemethoden besteht.

30

Bei der lichtgesteuerten Synthese von Nukleinsäure-Chips finden fotolabile Nukleosid-Derivate Verwendung. Hierbei findet der Kettenaufbau der Nukleinsäure-Fragmente üblicherweise mittels Phosphoramidit-Synthonen statt. Die Bausteine tragen jeweils eine temporäre Fotoschutzgruppe, die durch Lichteinstrahlung entfernt werden kann. Das Syntheseprinzip sieht eine zyklische Abfolge von Kondensations- und Deprotektions-Schritten

(durch Licht) vor. Die Effizienz, mit der eine solche lichtgesteuerte Synthese erfolgen kann, wird im Wesentlichen durch die verwendeten fotolabilen Schutzgruppen, insbesondere durch die Effizienz, mit der diese im Bestrahlungsschritt entfernt werden können, bestimmt. Bei den bislang zur lichtgesteuerten Synthese verwendeten Fotoschutzgruppen handelt es sich üblicherweise um die Schutzgruppen NVOC (S. P. A. Fodor et al., Science 251 (1991), 767 ff.), MeNPOC (A. C. Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91 (1994), 5022 ff.), DMBOC (M. C. Pirrung, J. Chem. 60 (1995), 1116 ff.) und NPPOC (A. Hassan et al., Tetrahedron 53 (1997), 4247 ff.). Weitere bekannte fotolabile Schutzgruppen in der Nukleosid- bzw. Nukleotidchemie sind o-Nitrobenzyl-Gruppen und ihre Derivate (vgl. z.B. Pillai, Org. Photochem. 9 (1987), 225; Walker et al., J. Am. Chem.Soc. 110 (1988), 7170). Als weitere fotolabile Schutzgruppe wurde die 2-(o-Nitrophenyl)ethyl-Gruppe (Pfleiderer et al., In: "Biosphosphates and their Analogues - Synthesis, Structure, Metabolism and Activity", ELSEVIER Science Publishers B.V. Amsterdam (1987), 133 ff.) sowie Derivate davon (WO97/44345 und WO96/18634) vorgeschlagen.

Die gegenwärtig für die lichtgesteuerte Synthese von Nukleinsäuren verwendeten fotolabilen Schutzgruppen. (z.B. NVOC, MeNPOC, NPPOC) zeichnen sich im Allgemeinen durch einen vergleichsweise niedrigen Absorptionskoeffizienten bei der Wellenlänge der Lichteinstrahlung aus. Die Bestrahlung der fotolabilen Nukleosid-Derivate erfolgt üblicherweise mit Hg-Hochdrucklampen bei einer Wellenlänge von 365 nm. Der niedrige Absorptionskoeffizient der verwendeten fotolabilen Schutzgruppe bei dieser Wellenlänge hat zur Folge, dass nur ein sehr geringer Anteil des eingestrahlten Lichts zur Anregung der Moleküle verwertet werden kann. Desweiteren handelt es sich bei den verwendeten fotolabilen Schutzgruppen zumeist um farblose Derivate. Dies wiederum hat zur Folge, dass es während der Synthese nicht möglich ist, mit einfachen spektroskopischen Methoden zu detektieren, ob die fotolabile Schutzgruppe sich noch am Nukleosid-Derivat befindet oder bereits teilweise oder

vollständig durch den Lichteintrag abstrahiert worden ist. Es lässt sich somit der Vorgang der Abstraktion nur schwer oder gar nicht verfolgen.

5 DE 101 32 025.6 und PCT/EP02/07389 schlagen die Verwendung von zweistufigen Schutzgruppen vor, wobei die zweistufigen Schutzgruppen durch einen Belichtungsschritt aktiviert und einen anschließenden chemischen Behandlungsschritt abgespalten werden. Vorzugsweise handelt es sich bei den zweistufigen Schutzgruppen um Tritylderivate, die mit einer photoaktivierbaren Schutzgruppe gekoppelt sind. Weiterhin können die
10 Tritylderivate auch fluoreszierende Gruppen enthalten.

Um die Nachteile des vorveröffentlichten Standes der Technik zu beseitigen, verknüpft man gemäß vorliegender Erfindung spezifische photoaktivierbare Gruppen mit einer zweiten Komponente, deren
15 Abspaltungsbedingungen orthogonal zu den der photoaktivierbaren Gruppen sind, und deren Entfernung erst zur Freisetzung der eigentlichen Schutzgruppe führt, die durch chemische Mittel, z.B. säurekatalysiert, abgespalten werden kann. Die durch chemische Mittel abgespaltene Schutzgruppe, die vorzugsweise farbig oder/und fluoreszierend ist, kann
20 zur Qualitätskontrolle bei der Synthese von Biopolymeren herangezogen werden.

Gemäß vorliegender Erfindung wird eine neuartige Schutzgruppe bereitgestellt, bei der der Aktivierungsschritt lichtinduziert erfolgt und der
25 eigentliche Entschützungs-schritt am Reaktionszentrum durch chemische Mittel, z.B. säurekatalysiert, stattfindet (Abb. 1). Diese neuartige Schutzgruppe bzw. diese Schutzgruppe tragende Moleküle können für die Synthese von Biopolymeren eingesetzt werden.

30 Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Synthese von Biopolymeren durch schrittweisen Aufbau aus Synthesebausteinen, die Schutzgruppen tragen, wobei man mindestens einen Synthesebaustein

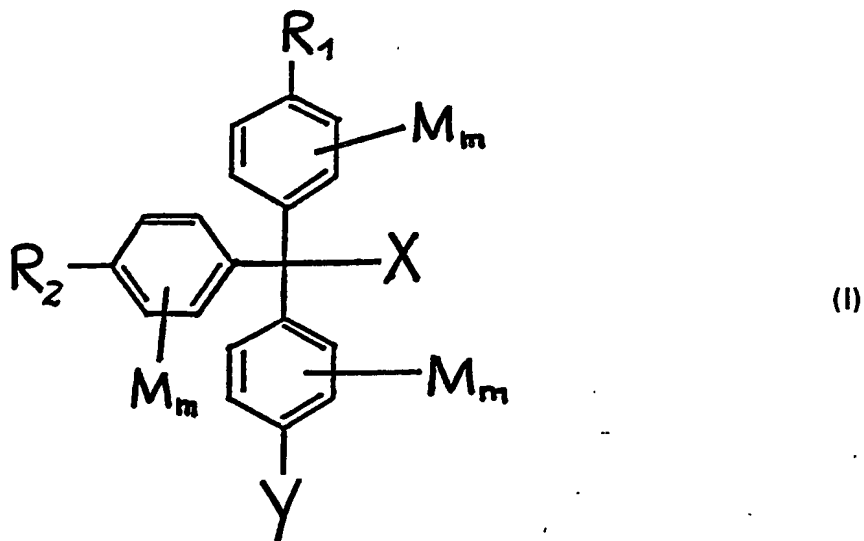
verwendet, der eine zweistufige Schutzgruppe trägt, die durch einen Belichtungsschritt aktiviert und durch einen anschließenden chemischen Behandlungsschritt abgespalten wird, wobei als photoaktivierbare Gruppe eine triplettensensibilisierte photoaktivierbare Gruppe, eine markierte, z.B. fluoreszierende photoaktivierbare Gruppe oder/und einer markierte, z.B. fluoreszierende und triplettensensibilisierte photoaktivierbare Gruppe verwendet wird. Der Belichtungsschritt umfasst vorzugsweise die Abspaltung einer ersten photolabilen Komponente der Schutzgruppe, wobei eine zweite Komponente der Schutzgruppe zurückbleibt, die gegenüber den bei Abspaltung der ersten Komponente herrschenden Bedingungen im Wesentlichen stabil ist und die anschließend durch einen chemischen Behandlungsschritt abgespalten werden kann. Der chemische Behandlungsschritt umfasst vorzugsweise eine Behandlung mit Base, eine Behandlung mit Säure, eine Oxidation, eine Reduktion oder/und katalytische, z.B. eine enzymatische, Reaktion. Besonders bevorzugt umfasst der chemische Behandlungsschritt eine Säurebehandlung.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verwendet man als zweistufige Schutzgruppe eine derivatisierte Tritylgruppe. Tritylgruppen zeichnen sich durch ihre hervorragenden Abspaltbarkeit, insbesondere durch Behandlung mit Säure, aus. Die erfindungsgemäßen zweistufigen Tritylschutzgruppen sind hingegen vorzugsweise nicht säurelabil, sondern werden erst nach Aktivierung und Abspaltung einer oder mehrerer fotolabiler Komponenten in eine säurelabile Form überführt.

Triplettsensibilisierte photoaktivierbare Gruppen bzw. markierte, z.B. fluoreszierende, und triplettensensibilisierte photoaktivierbare Gruppen weisen einerseits einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten bei der eingestrahlten Wellenlänge auf, um zu einer signifikanten Erhöhung der Population im Triplettzustand beizutragen, und sind andererseits in der Lage, ein tertiäres Radikal in der aci-nitro Form über I- oder M-Effekte zu stabilisieren. Dies führt zu einer Erhöhung der Gesamtquantenausbeute des

Aktivierungsschrittes. Markierte photoaktivierbare Gruppen (ohne Triplettsensibilisierung) zeigen lediglich einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten bei der eingestrahlten Wellenlänge, nehmen jedoch keinen direkten Einfluss auf den Aktivierungsprozess. Alle der genannten Typen von photoaktivierbaren Gruppen sind besonders in der Qualitätskontrolle geeignet, beispielsweise bei fluidischen Mikroprozessoren, wie etwa in WO 00/13018 beschrieben.

Besonders bevorzugt wird daher ein Synthesebaustein mit einer zweistufigen Schutzgruppe verwendet, der die allgemeine Formel (I) aufweist:



wobei R_1 und R_2 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff, (L)- R_3 , O-(L)- R_3 , $N(R_3)_2$, NHZ und M, R_3 eine C_1 - C_8 Alkylgruppe, eine C_2 - C_8 Alkenylgruppe, eine C_2 - C_8 -Alkynylgruppe, eine C_6 - C_{25} Arylgruppe oder/und eine C_5 - C_{25} -Heteroarylgruppe darstellt, die gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten aufweisen können, L eine gegebenenfalls vorhandene Linkergruppe ist, die z.B. $-(CH_2)_n$ -, $-(CH_2)_n$ -COO-, $-(CH_2)_n$ -CONH-

oder $-(CH_2)_n-SO_2O-$, $-(CH_2)_n-O-$, $-(CH_2)_n-S-$ oder $-(CH_2)_n-NH-$ bedeutet, und n eine ganze Zahl von 0 bis 20 ist, M jeweils unabhängig eine gegebenenfalls über eine Linkergruppe L (wie zuvor definiert) gebundene Markierung ist und m jeweils unabhängig eine ganze Zahl von 0 bis 4, vorzugsweise 0, 1 oder 2 ist, X den Synthesebaustein darstellt, Y jeweils unabhängig eine photoaktivierbare Schutzgruppe wie zuvor angegeben ist, Z eine Aminoschutzgruppe ist und wobei gegebenenfalls R_1 oder/und R_2 durch Y ersetzt sein können.

Die Alkyl-, Alkenyl- und Alkinylgruppen können linear oder cyclisch, geradkettig oder verzweigt sein. Die Aryl- oder Heteroarylgruppen, z.B. N-, O- oder/und S-Heteroarylgruppen, können mono- oder polycyclisch sein. Beispiele für Substituenten von Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- und Heteroarylgruppen sind Halogen, z.B. F, Cl, Br, I, OH, SH, $-O-$, $-S-$, $-S(O)_2-$, NO_2 , CN, COOH, $CO-C_1-C_8-Alkyl$, $COO-C_1-C_8-Alkyl$, $OCO-C_1-C_8-Alkyl$, $CONH-C_1-C_8-Alkyl$, $CON-(C_1-C_8-Alkyl)_2$, $C_1-C_8-Alkyl$, $C_2-C_8-Alkenyl$, $C_2-C_8-Alkinyl$, $C_1-C_8-Alkoxy$, $-S-C_1-C_8-Alkyl$, Di- $(C_1-C_8-Alkyl)$ -Amino und NHZ, wobei die Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl- und Alkoxycarbonylgruppen wiederum mit Halogen substituiert sein können. Bevorzugte Bedeutungen für R_1 und R_2 sind Wasserstoff, Dialkylamin, z.B. N,N-Dimethyl, O-Methyl, OCOO-Methyl oder eine geschützte Aminogruppe, z.B. eine mit einer geeigneten Carbonsäure in eine Amidfunktion überführte Aminogruppe. Die Anzahl der Kohlenstoffatome in den Resten R_1 und R_2 der Verbindung ist vorzugsweise auf jeweils 25 beschränkt.

Die Erfindung erfasst auch Verbindungen, die mehrere photoaktivierbare Schutzgruppen tragen, insbesondere Verbindungen der Formel (I), worin zumindest einer von R_1 oder R_2 durch eine photoaktivierbare Schutzgruppe Y ersetzt ist. Vorzugsweise sind 1 bis 3 photoaktivierbare Schutzgruppen vorhanden. Weiterhin können eine oder mehrere Markierungsgruppen vorhanden sein, die an die photoaktivierbare Komponente oder/und an die

chemisch aktive Komponente gebunden sein können. So können bei den Verbindungen (I) eine oder mehrere Markierungsgruppen an den o- oder/und m-Positionen der Phenylringe im Tritylsystem vorhanden sein.

- 5 Durch Variation der Reste R_1 und R_2 und Substitution eines oder beider Reste durch photoaktivierbare Schutzgruppen lässt sich die Säurelabilität den gewünschten Anforderungen anpassen.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden markierte photoaktivierbare Gruppen der Formel (II) verwendet:



20 worin Ar ein kondensiertes polycyclisches, vorzugsweise tetra-, penta- oder hexacyclisches, fluoreszierendes Aryl- oder Heteroaryl ist, S_1 und S_2 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff, einer C_1 - C_8 -Alkylgruppe, einer C_2 - C_8 -Alkenylgruppe, einer C_2 - C_8 -Alkynylgruppe, einer C_6 - C_{25} -Aryl- oder/und einer C_6 - C_{25} -Heteroarylgruppe, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen können, und Q eine Gruppe zur Bindung der photolabilen Komponente an die chemisch abspaltbare Komponente ist. Die Anzahl der Kohlenstoffatome in den Resten Ar, S_1 und S_2 der Verbindung (II) ist vorzugsweise auf jeweils 25 beschränkt.

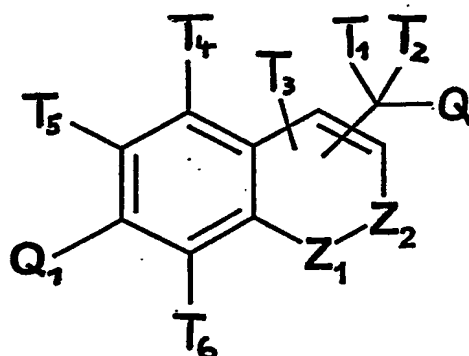
30

Beispiele für geeignete fluoreszierende Arylreste sind Benzo[b]fluoranthren, Fluoranthren, 9,10-Diphenylanthracen, Acenaphthylen oder Pyren.

Substituenten der Gruppen Ar, S₁ und S₂ sind wie zuvor für die Verbindungen der Formel (I) definiert. Q ist vorzugsweise SO₂, OCO, OCS oder CS₂.

- 5 Besonders bevorzugt sind Verbindungen (II), bei denen S₁ und S₂ H sind, z.B. die Verbindung PyMOC (wie in US-Patent 6,147,205 angegeben).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform verwendet man eine photoaktivierbare Gruppe der allgemeinen Formel (III)

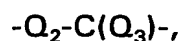


(III)

- 20 worin T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ und T₆ jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff, C₁-C₈-Alkyl, C₂-C₈-Alkenyl, C₂-C₈-Alkynyl, C₁-C₈-Alkoxy, C₂-C₈-Alkoxycarbonyl, C₆-C₂₅-Aryl oder Aryloxy oder/und C₅-C₂₅-Heteroaryl oder Heteroaryloxy, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen können, und T₁ oder/und T₂ zusätzlich Trialkylsilyl bedeuten können, und einer von T₃ und T₄ NO₂ sein kann, mit der Maßgabe, dass dann der andere H ist; Q₁ Wasserstoff, gegebenenfalls substituiertes C₁-C₄-Alkoxy oder Di(C₁-C₄-Alkyl)-amino bedeutet, Z₁ und Z₂ zusammen -OC(O)-, -NT₇C(O)- oder -CT₈=CT₉ bedeuten, wobei T₈ und T₉ wie T₃ - T₆ definiert sind und T₉ zusätzlich NO₂ bedeuten kann, und benachbarte Gruppen, z.B. T₈ und T₉ einen 5- oder 6-gliedrigen carbocyclischen oder heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden können und Q eine Gruppe zur
- 25
- 30

Bindung der photolabilen Komponente an die chemisch abspaltbare Komponente ist. Die Anzahl der Kohlenstoffatome an den Resten T_1 - T_9 der Verbindung (III) ist vorzugsweise auf jeweils 25 beschränkt.

- 5 Die möglichen Substituenten der jeweiligen Gruppen sind dabei wie zuvor für die Verbindungen der Formel (I) definiert. Q bedeutet vorzugsweise eine Gruppe der allgemeinen Formel:

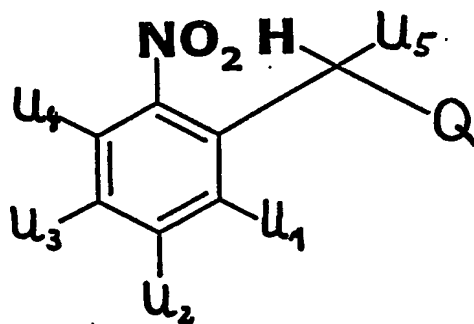


10

wobei Q_2 -O-, -S-, -CH₂O- oder -CH₂S- ist und Q_3 =O oder =S ist. Beispiele für geeignete Verbindungen der Formel (III) sind z.B. in WO 02/20150 beschrieben.

- 15 In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden markierte photoaktivierbare Gruppen der allgemeinen Formel (IV) verwendet:

20



(IV)

25

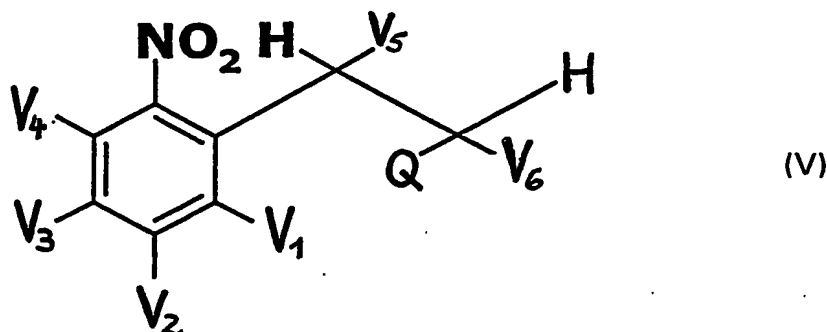
- 30 worin U_1 , U_2 , U_4 und U_5 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff, Halogen, NO_2 , U_6 , (L)- U_6 , O-(L)- U_6 , $N(U_6)_2$ und NHZ, U_6 C₁-C₈-Alkyl, C₂-C₈-Alkenyl, C₂-C₈-Alkynyl, C₆-C₂₅-Aryl oder C₅-C₂₅-Heteroaryl bedeutet, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen können, L eine gegebenenfalls vorhandene Linkergruppe, z.B. wie für die Verbindungen (I)

definiert ist, U_3 eine gegebenenfalls über eine Linkergruppe, z.B. wie für die Verbindung (I) definiert, gebundene Markierungsgruppe, z.B. eine fluoreszierende Gruppe, ist und Q eine Gruppe zur Bindung der photolabilen Komponente an die chemisch abspaltbare Komponente ist. Die Anzahl der Kohlenstoffatome in den Resten $U_1 - U_5$ ist vorzugsweise auf jeweils 25
5 beschränkt. Benachbarte Reste können gegebenenfalls einen 5- oder 6-gliedrigen carbocyclischen oder heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden.

10 Die Definition der möglichen Substituenten an den Resten U_1, U_2, U_4 und U_5 ist wie für die Verbindungen (I) beschrieben. Q ist vorzugsweise SO_2 , OCO, OCS, CS_2 , CH_2SO_4 , CH_2OCO , CH_2OCS , CH_2CS_2 etc. Der Rest U_3 hat vorzugsweise die Struktur $-O-L-NHCOM$, wobei L ein Linker mit einer Kettenlänge von vorzugsweise 1-10 Atomen, z.B. C-Atome, und
15 gegebenenfalls Heteroatome, wie O, S oder N, ist und M eine Markierungsgruppe, z.B. eine fluoreszierende Gruppe, wie etwa eine Pyren- oder Cumaringruppe, ist.

Die Verbindungen dieses Typs basieren auf konventionellen O-Nitrobenzylgruppen, wie z.B. NPPOC, NVOC, MeNPOC, in die zusätzlich
20 eine Fluorophor eingeführt wurde. Das resultierende photoaktivierbare Molekül weist eine Markierung, nicht jedoch eine Triplettensensibilisierung auf.

25 In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform verwendet man photoaktivierbare Gruppen der Formel (V), bei denen es sich vorzugsweise um triplettensensibilisierte und gegebenenfalls markierte Gruppen handelt:



10
 worin V_1 , V_2 , V_3 , V_4 , V_5 und V_6 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff, Halogen, NO_2 , V_7 , (L)- V_7 , O-(L)- V_7 , $\text{N}(V_7)_2$, NHZ und M, wobei V_7 C_1 - C_8 -Alkyl, C_2 - C_8 -Alkenyl, C_2 - C_8 -Alkynyl, C_6 - C_{25} -Aryl oder C_5 - C_{25} -
 15 Heteroaryl bedeutet, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen können, L eine gegebenenfalls vorhandene Linkergruppe, z.B. wie für die Verbindungen (I) definiert ist, V_5 und V_6 zusätzlich Trialkylsilyl bedeuten können, M eine gegebenenfalls über eine Linkergruppe gebundene Markierung ist und Q eine Gruppe zur Bindung der photolabilen
 20 Komponente an die chemisch abspaltbare Komponente ist. Die Anzahl der Kohlenstoffatome in den Resen V_1 - V_6 ist vorzugsweise auf jeweils 25 beschränkt. Benachbarte Reste können gegebenenfalls einen 5- oder 6-gliedrigen carbocyclischen oder heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden.

25
 Der Rest V_5 ist besonders bevorzugt eine Aryl-, Aryloxy-, Heteroaryl- oder Heteroaryloxygruppe, die unsubstituiert sein kann oder bis zu drei Substituenten (wie zuvor definiert) aufweisen kann. Besonders bevorzugt sind polycyclische Aryl-, Aryloxy-, Heteroaryl- oder Heteroaryloxygruppen,
 30 die eine Triplettensensibilisierung zeigen, und gegebenenfalls eine Eigenfluoreszenz aufweisen können, insbesondere wenn sie vier oder mehr

kondensierte bzw. anellierte Ringe enthalten, z.B. Pyrene, Benzo[b]fluoranthrene, Fluoranthrene, 9,10-Diphenylanthracene, Acenaphthylene oder entsprechende Oxyderivate etc.

- 5 Die Erfindung umfasst auch Verbindungen, die mehrere Markierungen tragen, die unabhängig voneinander nachweisbar sind. Beispiele für geeignete Markierungen sind Fluoreszenzgruppen, Lumineszenzgruppen, elektrisch detektierbare Gruppen, z.B. Ferrocene, farbige Gruppen, radioaktive Gruppen, durch NMR nachweisbare Gruppen etc. Vorzugsweise
- 10 enthalten die Markierungen mindestens eine Fluoreszenzgruppe, die mit einer anderen, unabhängig nachweisbaren Fluoreszenzgruppe oder einer anderen Art von Markierung, wie oben genannt, kombiniert werden kann. Vorzugsweise ist eine Markierung an die photolabile Komponente der Schutzgruppe gebunden und die andere Markierung an die chemisch
- 15 abspaltbare Komponente gebunden, so dass die selektive Abspaltung der photolabilen Komponente durch Verlust der ersten Markierung, aber Beibehalt der zweiten Markierung und die Abspaltung der chemischen Komponente durch Verlust der zweiten Markierung detektiert werden kann. Beispielsweise umfasst die Erfindung Verbindungen (I), die mehrere
- 20 fluoreszierende Gruppen tragen, z.B. Verbindungen, bei denen Y eine fluoreszierende Fotoschutzgruppe oder/und R_3 bzw. Z fluoreszierende Gruppen am Tritylgerüst darstellen (R. Ramage, F.O. Wahl, Tetrahedron Lett., 34 (1993), 7133) oder Moleküle, bei denen die Fluoreszenz durch Substitution am Tritylgerüst (J.L. Fourrey et al., Tetrahedron Lett., 28
- 25 (1987), 5157) eingeführt wurde.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Markierungsgruppe an der chemisch abspaltbaren Komponente eine Fluoreszenzgruppe, z.B. eine Cumarin- oder Pyrengruppe, die über eine Linkerguppe, z.B. eine Gruppe

30 wie zuvor definiert, an das Tritylgrundgerüst gekoppelt ist, z.B. in p-, o- oder/und m-Position der Phenylringe im Tritylsystem.

Diese Markierungsgruppen können zur Qualitätskontrolle von Biochips herangezogen werden. Dies kann beispielsweise in Biochip-Trägern gemäß WO 00/13018 geschehen. Bei Verwendung von fluoreszierenden Markierungsgruppen ist darauf zu achten, dass die Anregungs- und Emissionswellenlängen mit der lichtinduzierten Aktivierung nicht interferieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird zur Synthese von Biopolymeren eingesetzt, wobei das zu synthetisierende Biopolymer schrittweise aus mehreren Synthesebausteinen aufgebaut wird. Besonders bevorzugt wird das Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, z.B. DNA oder RNA, eingesetzt. Es ist jedoch anzumerken, dass das Verfahren auch zur Synthese von anderen Biopolymeren, wie etwa Peptiden, Peptidnukleinsäuren (PNA) oder Sacchariden, geeignet ist. Der Synthesebaustein kann ein monomerer Baustein, z.B. ein Nukleosid-Derivat, oder ein Peptid-Derivat, aber auch ein oligomerer Baustein, z.B. ein Dimer oder Trimer, d.h. beispielsweise ein Di- oder Trinukleosid-Derivat, oder ein Di- oder Tripeptid-Derivat sein. Besonders bevorzugt ist der Synthesebaustein ein Phosphoramidit-Baustein. Es können jedoch auch andere Nukleotidsynthese-Bausteine, z.B. Phosphat- oder Phosphonat-Bausteine, verwendet werden. Weiterhin können als Synthesebausteine auch Linker- bzw. Spacer-Bausteine, z.B. als Phosphoramidite, eingesetzt werden. Besonders bevorzugte Linker bzw. Spacer als Träger zweistufiger Schutzgruppen sind in DE 100 41 539.3 beschrieben.

Die erfindungsgemäßen, eine zweistufige Schutzgruppe tragenden Synthesebausteine haben im Allgemeinen stärker lipophile Eigenschaften als die bislang die im Stand der Technik verwendeten Synthesebausteine. Durch diese Lipophilie erhöht sich die Solubilität der Synthesebausteine, insbesondere der Phosphoramidit-Synthonen in organischen Lösungsmitteln. Die dadurch mögliche homogenere Reaktionsführung führt im Vergleich zu den reinen fotolabilen Phosphoramidit-Synthonen zu einer höheren

Kopplungseffizienz. Durch die Abspaltung des farbigen Tritylkations der erfindungsgemäßen Fotoschutzgruppen, welches einen wesentlich höheren Absorptionskoeffizienten besitzt als die Abspaltungsprodukte bei anderen Fotoentschützungsprozessen, eröffnet sich weiterhin die Möglichkeit zur direkten online Prozesskontrolle. Dies führt zu einer Verbesserung bei der Qualitätskontrolle für Biochips.

Die Tritylgruppe der erfindungsgemäßen Fotoschutzgruppen ermöglicht außerdem die selektive Funktionalisierung der 5'-Hydroxyfunktion. Dies führt zu einer enormen Kostenreduzierung, da eine Trennung der 3'-5'-Isomere entfällt.

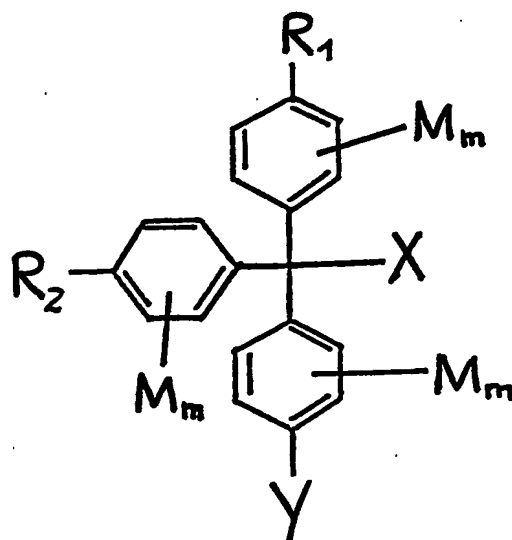
Besonders bevorzugt sind daher gemäß vorliegender Erfindung Phosphoramidit-Bausteine, die die zweistufige Schutzgruppe am 5'-O-Atom des Zuckers, insbesondere der Ribose oder der Deoxyribose, tragen.

Die Synthese der Biopolymeren kann auf übliche Weise durchgeführt werden, beispielsweise auf einer Festphase. Besonders bevorzugt werden mehrere Biopolymere, die eine unterschiedliche Sequenz von Synthesebausteinen tragen, auf einem einzigen Träger in Form eines Array in situ erzeugt.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

25

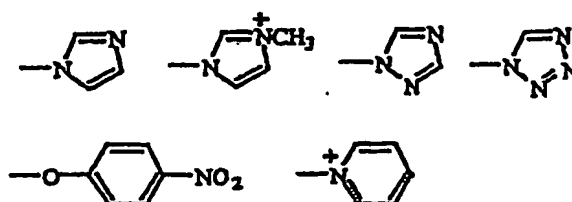
30



(I)

wobei R_1 , Y , M und m wie zuvor definiert sind und X einen Synthesebaustein zur Synthese von Biopolymeren oder eine Abgangsgruppe darstellt und wobei gegebenenfalls R_1 oder/und R_2 durch Y ersetzt sein können.

Wenn X eine Abgangsgruppe ist, handelt es sich um eine Gruppe, die bei einer Reaktion der Verbindung (I) mit einer anderen Verbindung abgespalten werden kann. Vorzugsweise ist X eine durch Reaktion mit einer Nukleophil, gegebenenfalls in Gegenwart einer Hilfsbase, wie Pyridin, abspaltbare Abgangsgruppe. Bevorzugte Beispiele für X sind: Cl , Br , I , Tosylat, Mesylat, Trifluorsulfonat etc.



Die schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Schutzgruppenkonzepts ist in **Abbildung 1** gezeigt. Der Synthesebaustein (A) trägt eine zweistufige Schutzgruppe (B-C). In einem ersten Belichtungsschritt wird der fotolabile Anteil (B) der Schutzgruppe abgespalten. Durch einen zweiten chemischen Behandlungsschritt, z.B. durch Zugabe von Säure, wird die chemisch labile Komponente (C) der Schutzgruppe abgespalten, so dass der Synthesebaustein (A) in aktiver Form vorliegt.

Abbildungen 2 und 3 zeigen Beispielsubstanzen aus einer bevorzugten Klasse von erfindungsgemäßen zweistufigen Schutzgruppen. Sie basieren auf der säurelabilen Tritylgruppe, enthalten jedoch in der p-Position eines Phenylrests eine photolabile triplettensensibilisierte Komponente (V), welche die Säureempfindlichkeit der Tritylgruppe verringert bzw. vollständig blockiert. Die photolabile Komponente in **Abbildung 3** zeigt Eigenfluoreszenz. Durch Belichtung und Abspaltung der photolabilen Komponente wird die Schutzgruppe in eine säurelabile Form überführt und kann anschließend in Gegenwart von Säure unter Freisetzung des ungeschützten Synthesebausteins abgespalten werden.

20

Abbildung 4 zeigt eine weitere Beispielsubstanz gemäß vorliegender Erfindung, bei der neben der photolabilen Schutzgruppe Y noch ein fluoreszierender Rest (anstelle von R₁) an das Tritylgerüst gekoppelt ist.

25

Abbildung 5 zeigt ein bevorzugtes Beispiel für eine Verbindung (II), wobei Q eine Gruppe zur Kopplung der photolabilen Komponente an das Tritylgrundgerüst ist.

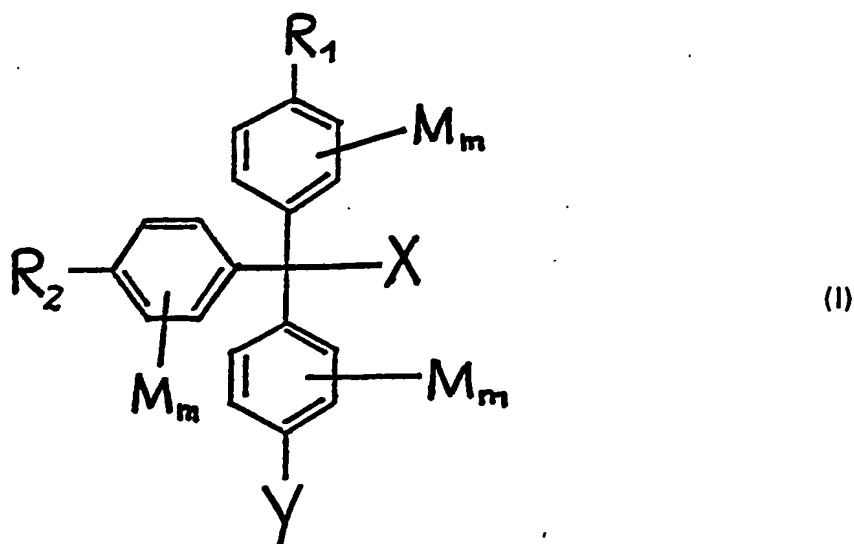
30

Abbildung 6 zeigt ein bevorzugtes Beispiel für eine Verbindung (III), wobei L eine Linkergruppe und Q eine Gruppe zur Kopplung der photolabilen Komponente an das Tritylgrundgerüst ist.

Ansprüche

1. Verfahren zur Synthese von Biopolymeren durch schrittweisen
5 Aufbau aus Synthesebausteinen, die Schutzgruppen tragen, wobei
man mindestens einen Synthesebaustein verwendet, der eine
zweistufige Schutzgruppe trägt, wobei die zweistufige Schutzgruppe
durch einen Belichtungsschritt aktiviert und einen anschließenden
chemischen Behandlungsschritt abgespalten wird,
10 **dadurch gekennzeichnet,**
dass die Aktivierung durch Abspaltung einer photoaktivierbaren
Schutzgruppe erfolgt, die ausgewählt wird aus triplettensensibilisierten
photoaktivierbaren Gruppen, markierten photoaktivierbaren Gruppen
und triplettensensibilisierten und markierten photoaktivierbaren
15 Gruppen.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass der chemische Behandlungsschritt eine Behandlung mit Base,
20 eine Behandlung mit Säure, eine Oxidation, eine Reduktion oder/und
eine katalysierte, z.B. enzymatische, Reaktion umfasst.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass der chemische Behandlungsschritt eine Säurebehandlung
umfasst.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
30 dass man als zweistufige Schutzgruppe eine derivatisierte
Tritylgruppe verwendet.

5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Synthesebaustein mit der zweistufigen Schutzgruppe die
allgemeine Formel (I) aufweist:



wobei R_1 und R_2 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus
Wasserstoff, (L)- R_3 , -O-(L)- R_3 , $N(R_3)_2$, NHZ und M,

R_3 eine C_1 - C_8 Alkylgruppe, eine C_2 - C_8 -Alkenylgruppe, eine C_2 - C_8 -
Alkynylgruppe, eine C_6 - C_{25} -Arylgruppe oder/und eine C_5 - C_{25} -
Heteroarylgruppe darstellt, die gegebenenfalls Substituenten
aufweisen kann,

L eine gegebenenfalls vorhandene Linkergruppe ist,

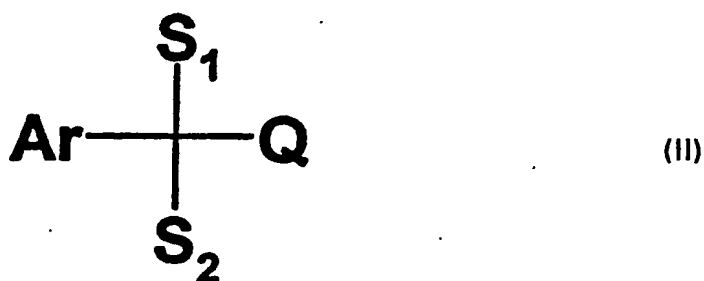
X den Synthesebaustein darstellt,

M jeweils unabhängig eine gegebenenfalls über eine Linkergruppe
gebundene Markierung ist und m jeweils unabhängig eine ganze Zahl
von 0 bis 4 ist,

Y jeweils unabhängig eine photoaktivierbare Schutzgruppe gemäß
Anspruch 1 ist,

Z eine Aminoschutzgruppe ist und
wobei gegebenenfalls R_1 oder/und R_2 durch Y ersetzt sein können.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine photoaktivierbare Gruppe der allgemeinen Formel (II)
verwendet,

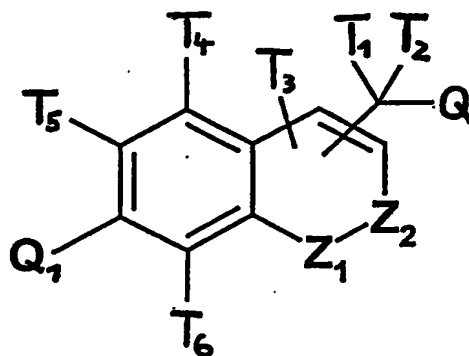


worin Ar ein kondensiertes polycyclisches fluoreszierendes Aryl-
oder Heteroaryl ist,

S_1 und S_2 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff,
einer C_1 - C_8 -Alkylgruppe, einer C_2 - C_8 -Alkenylgruppe, einer C_2 - C_8 -
Alkynylgruppe, einer C_6 - C_{25} -Arylgruppe oder einer C_5 - C_{25} -
Heteroarylgruppe, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen
können, und

Q eine Gruppe zur Bindung der photolabilen Komponente an die
chemisch abspaltbare Komponente ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine photoaktivierbare Gruppe der allgemeinen Formel (III)
verwendet:



(III)

worin T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ und T₆ jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff, C₁-C₈-Alkyl, C₂-C₈-Alkenyl, C₂-C₈-Alkynyl, C₁-C₈-Alkoxy, C₂-C₈-Alkoxycarbonyl, C₆-C₂₀-Aryl oder Aryloxy oder/und C₅-C₂₅-Heteroaryl oder Heteroaryloxy, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen können,

und T₁ oder/und T₂ zusätzlich Trialkylsilyl bedeuten können, und einer von T₃ und T₄ NO₂ sein kann, mit der Maßgabe, dass dann der andere H ist,

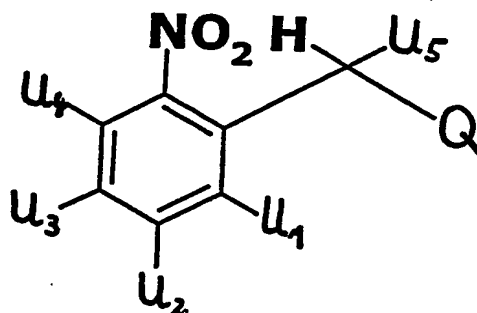
Q₁ Wasserstoff, gegebenenfalls substituiertes C₁-C₄-Alkoxy oder Di(C₁-C₄-Alkyl)-amino bedeutet,

Z₁ und Z₂ zusammen -OC(O)-, -NT₇C(O)- oder -CT₈=CT₉ bedeuten, wobei T₈ und T₉ wie T₃ - T₆ definiert sind und T₉ zusätzlich NO₂ bedeuten kann,

und benachbarte Gruppen T gegebenenfalls einen 5- oder 6-gliedrigen carbocyclischen oder heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Ring bilden können und

Q eine Gruppe zur Bindung der photolabilen Komponente an die chemisch abspaltbare Komponente ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine photoaktivierbare Gruppe der allgemeinen Formel (IV)
verwendet:

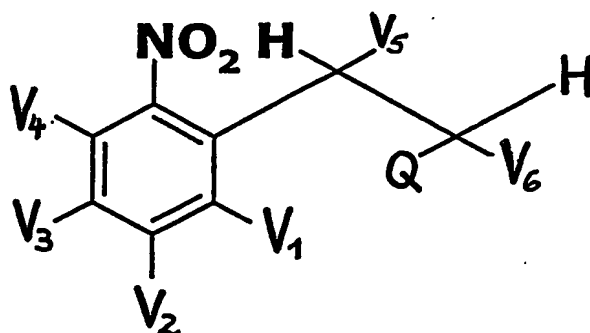


(IV)

worin U_1 , U_2 , U_4 und U_5 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff, Halogen, NO_2 , U_6 , $(\text{L})\text{-U}_6$, $\text{O}(\text{L})\text{-U}_6$, $\text{N}(\text{U}_6)_2$ und NHZ , U_6 $\text{C}_1\text{-C}_8\text{-Alkyl}$, $\text{C}_2\text{-C}_8\text{-Alkenyl}$, $\text{C}_2\text{-C}_8\text{-Alkynyl}$, $\text{C}_6\text{-C}_{25}\text{-Aryl}$ oder $\text{C}_5\text{-C}_{25}\text{-Heteroaryl}$ bedeutet, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen können, L eine gegebenenfalls vorhandene Linkergruppe ist, U_3 eine gegebenenfalls über eine Linkergruppe gebundene Markierung ist und

Q eine Gruppe zur Bindung der photolabilen Komponente an die chemisch abspaltbare Komponente ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine photoaktivierbare Gruppe der allgemeinen Formel (V)
verwendet:



(V)

worin V_1 , V_2 , V_3 , V_4 , V_5 und V_6 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Wasserstoff, Halogen, NO_2 , V_7 , (L)- V_7 , O-(L)- V_7 , $\text{N}(V_7)_2$, NHZ und M, wobei V_7 C_1 - C_8 -Alkyl, C_2 - C_8 -Alkenyl, C_2 - C_8 -Alkynyl, C_6 - C_{25} -Aryl oder C_5 - C_{25} -Heteroaryl bedeutet, die gegebenenfalls Substituenten aufweisen können, L eine gegebenenfalls vorhandene Linkergruppe ist und V_5 und V_6 zusätzlich Trialkylsilyl bedeuten können, M eine gegebenenfalls über eine Linkergruppe gebundene Markierung ist und Q eine Gruppe zur Bindung der photolabilen Komponente an die chemisch abspaltbare Komponente ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass die zweistufige Schutzgruppe mehrere unabhängig voneinander nachweisbare Markierungsgruppen trägt.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine erste Markierung an die photolabile Komponente und eine zweite Markierung an die chemisch abspaltbare Komponente gebunden ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass die zweistufige Schutzgruppe mindestens eine
Fluoreszenzmarkierung enthält.

5

13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Fluoreszenzmarkierung am Tritylgerüst einer Verbindung (I)
eingeführt wird.

10

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Biopolymere ausgewählt werden aus Nukleinsäuren,
Nukleinsäureanaloga, Peptiden und Sacchariden.

15

15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Biopolymere ausgewählt werden aus Nukleinsäuren und
Nukleinsäureanaloga.

20

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass als Synthesebausteine Phosphoramidite verwendet werden.

25

17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass Phosphoramiditbausteine verwendet werden, die die
zweistufige Schutzgruppe am 5'-O-Atom tragen.

30

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Synthese der Biopolymeren die Verwendung von Spacer-
bzw. Linkerbausteinen umfasst.

5

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Synthese der Biopolymeren auf einer Festphase
durchgeführt wird.

10

20. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine ortsabhängige Synthese von mehreren Biopolymeren mit
jeweils einer unterschiedlichen Sequenz von Synthesebausteinen auf
einem einzigen Träger durchgeführt wird.

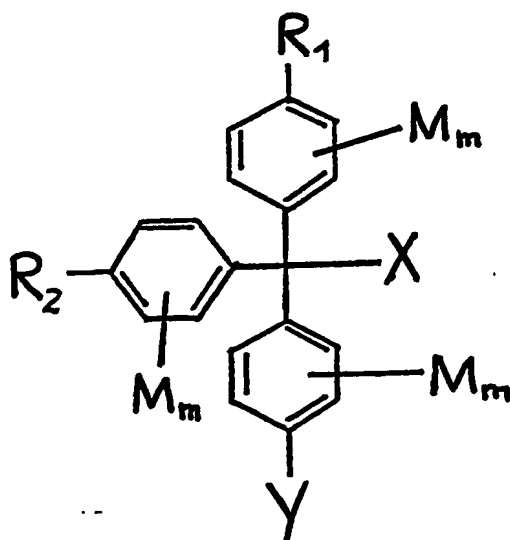
15

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass man einen Synthesebaustein mit zweistufiger Schutzgruppe zur
Qualitätskontrolle verwendet.

20

22. Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

25



30

(II)

wobei R_1 , Y, M und m wie in Anspruch 1 definiert sind und X einen Synthesebaustein oder eine Abgangsgruppe darstellt, wobei gegebenenfalls R_1 oder/und R_2 durch Y ersetzt sein können.

- 5 23. Verbindungen nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie mehrere unabhängig voneinander nachweisbare
Markierungen tragen.
- 10 24. Verbindungen nach Anspruch 22 oder 23,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie mindestens eine Fluoreszenzmarkierung tragen.
- 15 25. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) als
Synthesebausteine bzw. zur Herstellung von Synthesebausteinen für
die Synthese von Biopolymeren.
- 20 26. Verwendung nach Anspruch 25 zur Qualitätskontrolle bei der
Synthese von Biopolymeren auf einem festen Träger.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von
5 Biopolymeren durch schrittweisen Aufbau aus geschützten
Synthesebausteinen, die zweistufige Schutzgruppen tragen. Die
zweistufigen Schutzgruppen werden durch einen ersten Belichtungsschritt
aktiviert und einen anschließenden chemischen Behandlungsschritt
abgespalten. Es werden photoaktivierbare Komponenten verwendet, die
10 über intramolekulare Triplettensensibilisatoren den Aktivierungsprozess
erheblich beschleunigen oder/und über Fluoreszenzeigenschaften verfügen.
Die zweistufigen Schutzgruppen können insbesondere im Rahmen einer
Qualitätskontrolle Anwendung finden.

15

pu/ANM/29562PDE-23.12.2002

Abbildung 1

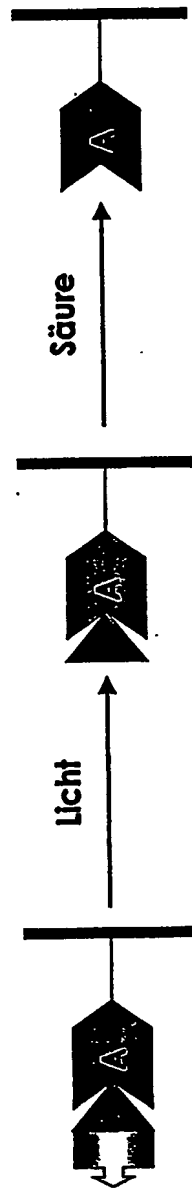


Abbildung 2

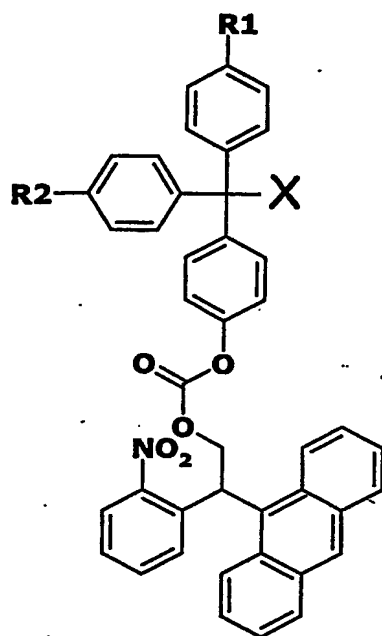


Abbildung 3

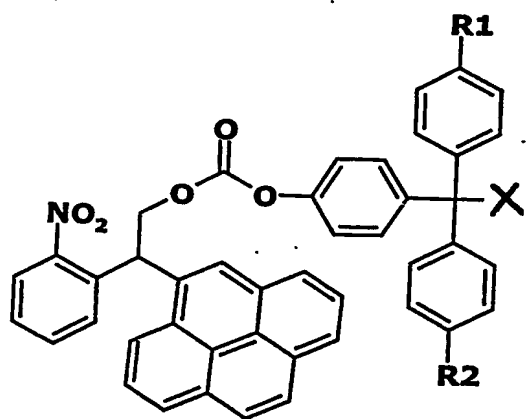


Abbildung 4

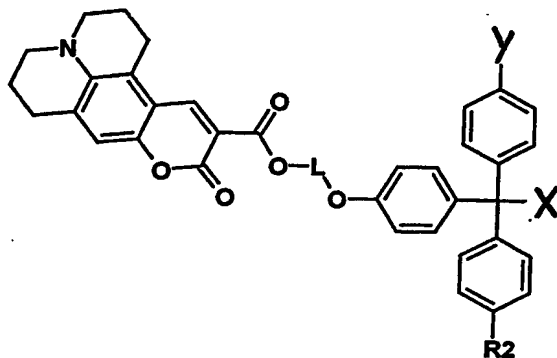


Abbildung 5

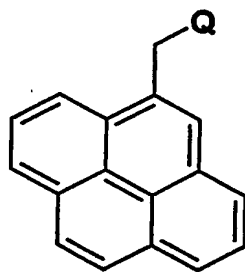


Abbildung 6

